

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АТФАЗЫ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Л. В. Татьянаенко, И. В. Выстороп, О. В. Доброхотова, И. Ю. Пихтелева, А. И. Котельников

ФГБУ «Институт проблем химической физики» РАН; Россия, 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, пр-т академика Семенова, 1

Контакты: Лилия Васильевна Татьянаенко kotel@icp.ac.ru

Цель исследования – изучение действия циклических гидроксамовых кислот (ЦГК) I–VI на функцию ферментов Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТФазы СР) и фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ).

Материалы и методы. Измерение активности Ca^{2+} -АТФазы и ФДЭ цГМФ.

Результаты. Показано, что ЦГК I–VI в исследованных концентрациях (0,1; 0,01 и 1 мкМ) разобщают гидролитическую и транспортную функции фермента Ca^{2+} -АТФазы СР, что предполагает антиметастатический эффект этих соединений. Так, в 0,1 мМ концентрации ЦГК тормозят активный транспорт Ca^{2+} через мембрану саркоплазматического ретикулума (СР) на 40 ± 4 % (ЦГК-I), 50 ± 5 % (ЦГК-II), 53 ± 5 % (ЦГК-III), 70 ± 8 % (ЦГК-V), 75 ± 8 % (ЦГК-VI) и ингибируют гидролиз аденозинтрифосфата (АТФ) на 20 ± 2 ; 0; 45 ± 5 ; 47 ± 3 % соответственно. ЦГК-III, ЦГК-V и ЦГК-VI ингибируют активный транспорт Ca^{2+} на 46 ± 5 ; 47 ± 5 и 60 ± 6 % и не ингибируют или ингибируют на 23 ± 2 и 27 ± 3 % гидролиз АТФ при 0,01 мМ концентрации. ЦГК-V обратимо и неконкурентно тормозит гидролитическую функцию Ca^{2+} -АТФазы СР с $K_i = 0,4$ мМ. Все исследованные ЦГК в 0,1 мМ концентрации тормозят активность ФДЭ цГМФ менее чем на 20 %.

Выводы. Полученные данные позволяют прогнозировать антиметастатическую активность соединений ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-V, ЦГК-VI и рекомендовать их для углубленного изучения на животных в качестве перспективных лекарственных препаратов антиметастатического действия.

Ключевые слова: Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума, фосфодиэстераза циклического гуанозинмонофосфата, циклические гидроксамовые кислоты

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-23-27

THE EFFECT OF CYCLIC HYDROXAMIC ACIDS ON ACTIVITY OF Ca^{2+} -ATPASE OF SARCOPLASMIC RETICULUM AND CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHODIESTERASE

L. V. Tat'yanenko, I. V. Vystorop, O. V. Dobrokhotova, I. Yu. Pikhteleva, A. I. Kotelnikov

Institute of Problems of Chemical Physics RAS; Academician Semenov avenue 1, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

Objective. The aim of the study was to research effect of new cyclic hydroxamic acids (CHA) I–VI on activity of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum and cyclic guanosine monophosphodiesterase.

Materials and methods. Activity of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum and cyclic guanosine monophosphodiesterase has been evaluated.

Results. It has been shown that at studied concentration (0.1 mM; 0.01 and 1 mM), CHA I–VI separate hydrolytic and transporting functions of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Therefore, the antimetastatic effect of these compounds is assumed. Thus, at concentration of 0.1 mM, CHA inhibit active transport of calcium through the sarcoplasmic reticulum membrane by 40 ± 4 % (CHA-I), 50 ± 5 % (CHA-II), 53 ± 5 % (CHA-III), 70 ± 8 % (CHA-V) and 75 ± 8 % (CHA-VI) and inhibit hydrolysis of ATP by 20 ± 2 %, 0 %, 0 %, 45 ± 5 % and 47 ± 3 % respectively. CHA-III, CHA-V and CHA-VI inhibit active transport of Ca^{2+} by 46 ± 5 %, 47 ± 5 % and 60 ± 6 %, and not inhibit or inhibit by 23 ± 2 % and 27 ± 3 % respectively, hydrolysis of ATP at concentration of 0.01 mM. CHA-V inhibits reversibly and non-competitively the hydrolytic function of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum with $K_i = 4 \times 10^{-5}$ M. All studied CHA inhibit activity of cyclic guanosine monophosphodiesterase at concentration of 0.1 mM, by less than 20 %.

Conclusion. The data obtained predicts the antimetastatic activity of compounds CHA-II, CHA-III, CHA-V, CHA-VI. We recommend to study of CHA-II, CHA-III, CHA-V, CHA-VI on animal models as promising antimetastatic drugs.

Key words: Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, cyclic guanosine monophosphodiesterase, cyclic hydroxamic acids

Введение

Гидроксамовые кислоты (RCONHOH) обладают широким спектром биологической активности [1]. Они тормозят рост экспериментальных опухолей [2], ингибируют металлоферменты [3], гистондеацетилазу [4], вовлечены в различные процессы опухолевой трансформации клеток. Ранее нами было показано, что антимагастатическое действие ряда химических соединений связано с ингибированием транспортной функции фермента Ca^{2+} -АТФазы СР, т. е. с нарушением баланса внутри- и внеклеточного содержания ионов Ca^{2+} [5–9], что приводит к уменьшению адгезии метастазирующих клеток к эндотелию капилляров [10].

Известно, что торможение фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) приводит к накоплению цГМФ, который является вторичным мессенджером, влияющим на вазодилаторный, антигипертензивный и антиагрегационный эффекты в живых организмах [11].

Целью настоящего исследования является изучение действия циклических гидроксамовых кислот (ЦГК) I–VI на функцию ферментов Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТФазы СР) и ФДЭ цГМФ.

Материалы и методы

В работе использовали альбумин человека, имидазол, цГМФ, нуклеотидазу, аденозинтрифосфат (АТФ) (Sigma, Япония), гистидин, этилендиаминтетрауксусную кислоту, трихлоруксусную кислоту, сахарозу, соли MgCl_2 , NaCl , KCl , CaCl_2 , оксалат натрия, молибдат аммония (MoNH_4) («Реахим», Россия) после соответствующей дополнительной очистки. Фермент Ca^{2+} -АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов по методу [12], поскольку белые волокна отличаются высокой активностью фосфоорилазы, альдолазы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы, глицерофосфатдегидрогеназы и Ca^{2+} -АТФазы СР.

Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы измеряли по методу [12]. Реакционная среда содержала 4 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ имидазола, 100 мМ NaCl , 5 мМ оксалата натрия, 0,04 мг альбумина и 2 мМ АТФ, pH 7,2. Реакцию инициировали добавлением 0,1 мМ CaCl_2 . Активность Ca^{2+} -АТФазы определяли по изменению pH среды. В результате указанной реакции соотношение протонов и фосфат-ионов составляет 1:1. Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона касательной к начальному участку кривой, описывающей кинетику накопления фосфат-ионов в результате гидролиза АТФ. Об активном транспорте ионов Ca^{2+} судили по времени их полного поглощения везикулами СР, что приводит к прекращению реакции гидролиза АТФ. Изменение гидролитической и транспортной

функций Ca^{2+} -АТФазы под действием ЦГК изучали в зависимости от концентрации соединений.

Относительную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$I = 100 (A_0 - A) / A_0,$$

где I – относительная активность; A_0 – удельное содержание фосфат-ионов в контрольной пробе; A – удельное содержание фосфат-ионов в опытной пробе.

Фермент ФДЭ цГМФ выделяли из коры головного мозга крыс линии «Вистар» [13].

Активность ФДЭ цГМФ определяли спектроскопическим методом при $\lambda = 735$ нм с использованием спектрофотометра «Specord M-40» (Carl Zeiss Jena, Германия) по количеству образовавшегося в процессе ферментативной реакции гуанозинмонофосфата (ГМФ), которое равно количеству фосфат-ионов, выделившихся из ГМФ при добавлении нуклеотидазы [13].

Соединения:

ЦГК-I (1-гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-II (1-гидрокси-3-изобутил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-III (1-гидрокси-3-бензил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-IV (1-гидрокси-3-изопропил-8-метил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-V (1-гидрокси-3-изобутил-8-метил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он)

ЦГК-VI (1-гидрокси-3-бензил-8-метил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он)

получены по методике, аналогичной таковой, упомянутой в работах [14, 15], по синтезу ЦГК на основе глицина ($R = H$) и DL-аланина ($R = \text{CH}_3$). Структуры соединений ЦГК I–VI приведены на рис. 1.

Результаты и обсуждение

Действие соединений ЦГК I–VI на гидролитическую и транспортную функции фермента Ca^{2+} -АТФазы СР исследовалось после 5 мин преинкубации препарата с ферментом. Растворы соединений готовили непосредственно перед добавлением в реакционную среду.

Как видно в табл. 1, соединения ЦГК-I, ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-IV, ЦГК-V, ЦГК-VI в 0,1 мМ концентрации на 40 ± 4 ; 50 ± 5 ; 53 ± 5 ; 0 ; 70 ± 7 ; 75 ± 7 % тормозят транспортную функцию Ca^{2+} -АТФазы СР и на 20 ± 2 ; 0 ; 11 ± 1 ; 45 ± 5 и 77 ± 5 % ингибируют гидролиз АТФ соответственно. Они преимущественно тормозят активный транспорт ионов Ca^{2+} через мембрану СР, разобщая гидролитическую и транспортную функции фермента.

Теоретическое соотношение $[\text{Ca}^{2+}] / [\text{АТФ}]$ (удельной скорости транспорта Ca^{2+} и удельной скорости

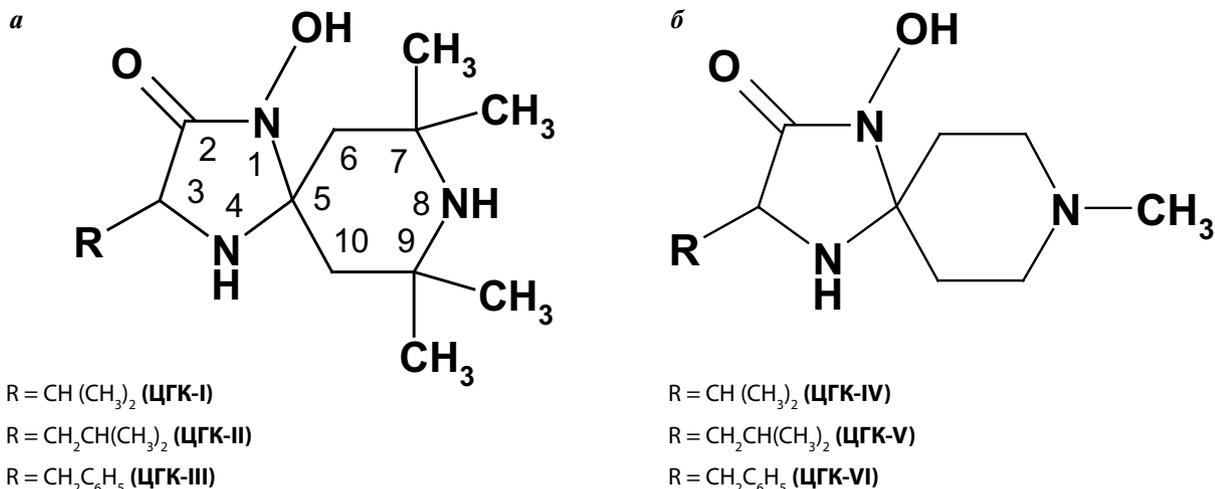


Рис. 1. Молекулярная структура циклических гидроксамовых кислот (ЦГК): а – ЦГК I–III; б – ЦГК IV–VI

гидролиза АТФ) равно 2, что соответствует переносу 2 ионов Ca^{2+} через мембрану СР при гидролизе 1 молекулы АТФ. В наших экспериментах это соотношение в норме равно 1,45. Разобшение гидролитической и транспортной функций Ca^{2+} -АТФазы СР при действии исследуемых ЦГК показывает, что при гидролизе 1 молекулы АТФ в везикулы СР переносится меньшее количество ионов Ca^{2+} , чем в норме (табл. 1, 2). Возникающее при этом изменение соотношения вне- и внутриклеточных ионов Ca^{2+} , безусловно, вызывает нарушение агрегации тромбоцитов, их связи с метастазирующими клетками и в конечном итоге предотвращает агрегацию последних к стенкам сосудов [10]. Так, ранее на примере металлокомплексов Pt (IV), Pd (II) [6] и ЦГК на основе глицина и DL-аланина было показано, что существует четкая корреляция индекса ингибирования метастазов меланомы В16 в опытах *in vivo* с коэффициентом транс-

мембранного переноса ионов Ca^{2+} в везикулы СР [6, 7]. Поэтому можно полагать, что соединения ЦГК-I (на основе DL-валина), ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-V (на основе DL-лейцина) и ЦГК-VI (на основе DL-фенилаланина) являются потенциальными препаратами антимагистатического действия.

Углубленное изучение одного из наиболее активных препаратов данного класса, ЦГК-V, показало, что ЦГК-V является обратимым ингибитором функции Ca^{2+} -АТФазы СР, так как гидролитическая и транспортная функции фермента после диализа в 100-кратном объеме инкубационной среды в течение 24 ч при 3 °С в значительной степени восстанавливаются (табл. 3).

Константу ингибирования (K_i) под влиянием ЦГК-V (рис. 2) рассчитывали, используя численные значения максимальных скоростей процесса гидролиза АТФ. Как видно из рис. 2, ЦГК-V неконкурентно тормозит гидролитическую функцию Ca^{2+} -АТФазы

Таблица 1. Влияние циклических гидроксамовых кислот на активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума

Индекс кислоты	Торможение активности Ca^{2+} -АТФазы СР (% от контроля) в зависимости от концентрации кислоты в пробах, мМ					
	0,1 мМ		0,01 мМ		0,001 мМ	
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
ЦГК-I	40 ± 4*	20 ± 2	20 ± 2*	10 ± 1	0	0
ЦГК-II	50 ± 5*	0	29 ± 3*	0	11 ± 1	0
ЦГК-III	53 ± 5*	0	46 ± 5*	0	34 ± 3*	0
ЦГК-IV	0	11 ± 1	0	0	0	0
ЦГК-V	70 ± 8*	45 ± 5	47 ± 5*	23 ± 2	33 ± 3	20 ± 2
ЦГК-VI	75 ± 7*	47 ± 5	60 ± 6*	27 ± 3	38 ± 4*	25 ± 2

Примечание. Даны среднеквадратичные ошибки результатов (6–9 опытов). * $p < 0,01$ активного транспорта Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) по сравнению с гидролизом аденозинтрифосфата (АТФ).

Таблица 2. Влияние циклических гидроксамовых кислот на соотношение $[Ca^{2+}]/[ATФ]$

Индекс кислоты	Концентрация кислоты, мМ								
	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001
	Гидролиз АТФ [P _i]/мг белка, мин			Активный транспорт Ca ²⁺ [Ca ²⁺]/мг белка, мин			Отношение [Ca ²⁺]/[АТФ]		
ЦГК-I	0,59	0,64	1,2	0,69	0,74	1,7	1,17	1,2	1,42
ЦГК-II	1,2	1,2	1,2	0,88	1,33	1,7	0,73	1,1	1,42
ЦГК-III	1,2	1,2	1,2	0,83	0,98	1,38	0,69	0,82	1,15
ЦГК-IV	1,2	1,25	1,2	1,8	1,74	1,7	1,5	1,4	1,42
ЦГК-V	1,78	1,5	1,3	0,69	1,0	1,23	0,4	0,66	0,95
ЦГК-VI	2,34	2,1	3,0	0,85	1,11	1,7	0,36	0,53	0,6

Примечание. Отношение $[Ca^{2+}]/[ATФ]$ в контроле составляет 1,45, $n = 6$ (число опытов с каждой кислотой).

Таблица 3. Влияние ЦГК-V на гидролитическую и транспортную функции Ca²⁺-АТФазы саркоплазматического ретикулума до и после диализа

Индекс кислоты	Торможение активности Ca ²⁺ -АТФазы СР (% от контроля)			
	До диализа		После диализа	
	Активный транспорт Ca ²⁺	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca ²⁺	Гидролиз АТФ
ЦГК-V	75 ± 8*	45 ± 5*	15 ± 3*	0

Примечание. В диализуемые пробы добавляем 0,1 мМ ЦГК-V. Приведены процентные значения 4 опытов по торможению активности Ca²⁺-АТФазы СР с препаратом ЦГК-V ($M \pm m$) %. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем (не содержащим проб кислот).

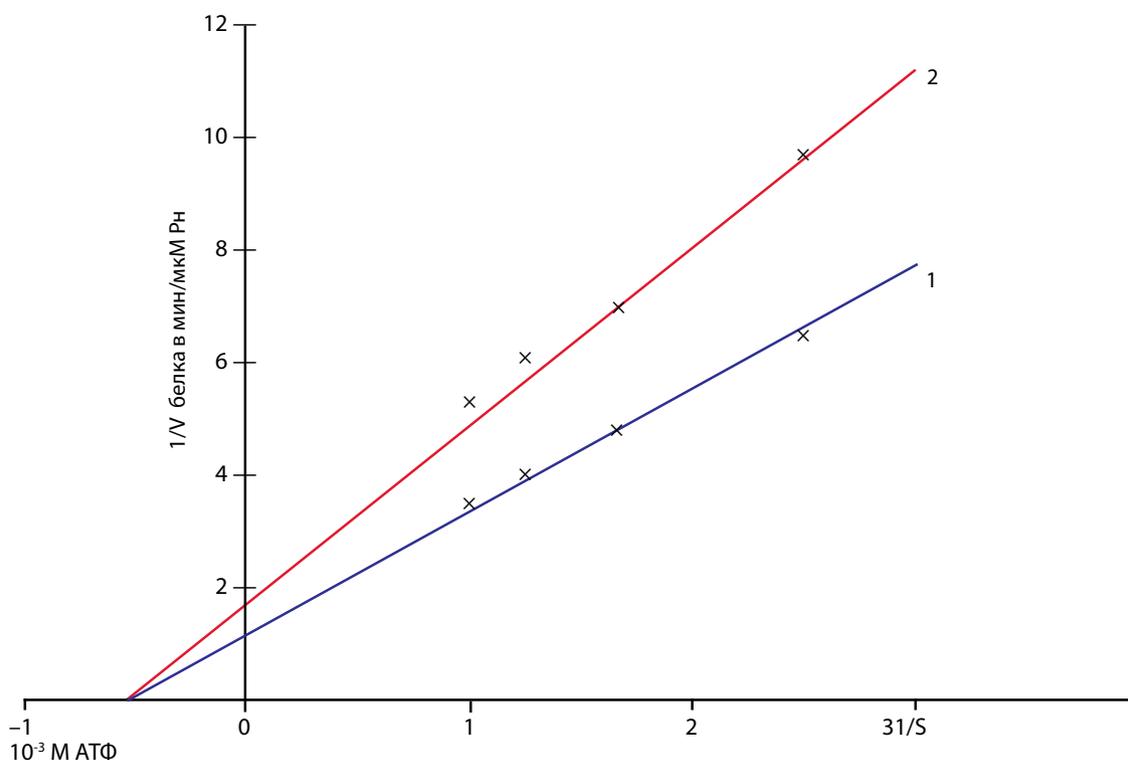


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза АТФ Ca²⁺-АТФазой саркоплазматического ретикулума от различных концентраций субстрата (1,0; 0,8; 0,6; 0,4 мМ) в координатах Лайнуивера – Берка: 1 – без ЦГК-V; 2 – с ЦГК-V в концентрации 0,1 мМ

СР с $K_i = 0,04$ мМ. Это свидетельствует о том, что ЦГК-V не связывается с активным центром фермента [16].

Как показали исследования, все изученные нами ЦГК (I–VI) менее чем на 26 ± 2 % тормозят гидролитическую функцию фермента ФДЭ цГМФ (табл. 4). Этот результат предполагает отсутствие их антиагрегационного, вазодилаторного и антигипертензивного действия [11].

Заключение

Полученные данные по влиянию ЦГК I–VI на функцию Ca^{2+} -АТФазы СР позволяют прогнозировать антиметастатическую активность ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-V, ЦГК-VI и рекомендовать их для углубленного изучения на животных в качестве перспективных лекарственных препаратов антиметастатического действия. Полученные данные также показали, что изученные ЦГК слабо влияют на функцию ФДЭ цГМФ и не могут рассматриваться в качестве препаратов антиагрегационного, антигипертензивного и вазодилаторного действия.

Работа частично финансирована РФФИ (проект № 13-03-01142).

Таблица 4. Влияние циклических гидроксамовых кислот на активность фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата

Индекс кислоты	Торможение активности ФДЭ цГМФ (% от контроля)		
	Концентрация кислоты, М		
	0,1	0,01	0,001
ЦГК-I	$26 \pm 3^*$	$14 \pm 2^*$	0
ЦГК-II	$15 \pm 2^*$	8 ± 1	0
ЦГК-III	8 ± 1	$5 \pm 0,5$	0
ЦГК-IV	$15 \pm 2^*$	$14 \pm 1^*$	0
ЦГК-V	$19 \pm 2^*$	$16 \pm 2^*$	13 ± 1
ЦГК-VI	$16 \pm 2^*$	$14 \pm 1^*$	8 ± 1

Примечание. Приведены процентные значения 6 опытов по торможению активности фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) с каждой кислотой ($M \pm m$) %. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем, не содержащим проб кислот. В качестве контроля принимали 100 % активность фермента без добавления изучаемой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Marmion C.J., Griffith D., Nolan K.B. Hydroxamic acids – an intriguing family of enzyme inhibitors and biomedical ligands. Eur J Inorg Chem 2004;3003–16.
- Eyborlu I.Y., Nahnen Y., Buslei R. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. J Neurochem 2005;93(4):992–9. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03098.x. PMID: 15857402.
- Whittaker M., Floyd C.D., Brown P., Gearing A.J. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. Chem Rev 1999;99:2735–76.
- Miller T.A., Witter D.J., Belvedere S.J. Histone deacetylase inhibitors. J Med Chem 2003;46(24):5097–5116. DOI: 10.1021/jm0303094. PMID: 14613312.
- Коновалова Н.П., Татьяненко Л.В., Волкова Л.М. и др. Ингибирующий эффект радиосенсибилизатора АК-2123 на экспериментальные метастазы в печени и активный транспорт ионов кальция. Вопросы онкологии 1997;43(3):305–12.
- Татьяненко Л.В., Коновалова Н.П., Богданов Г.Н. и др. Торможение активного транспорта ионов кальция металлокомплексами Pt(IV) Pd(II). Корреляция этого процесса с антиметастатическим действием препаратов. Журнал биомедицинской химии 2006;52(2):155–169.
- Татьяненко Л.В., Доброхотова О.В., Коновалова Н.П. и др. Влияние циклических гидроксамовых кислот на основе глицина и DL-аланина на активность гидролаз Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата. Химико-фармацевтический журнал 2013;47(5):135–7.
- Konvalova N.P., Völkova L.M., Tatyatenko L.V. et al. Inhibitory effect of radiosensitizer AK-2123 on experimental hepatic metastases and Ca^{2+} -active transport. Neoplasia 1997;44(6):361–5. PMID: 9605008.
- Konvalova N.P., Völkova L.M., Tatyatenko L.V. et al. Comparative inhibitory effect of radiosensitive AK-2123 and 5-Fu on experimental hepatic metastases sensitization. News letter 1997;4(2):3–6.
- Fidler I.J. Critical factor in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight G.H. Aclowes memorial awara lecture. Cancer Res 1990;50(19):6130–8. PMID: 1698118.
- Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М., 2004. С. 360–365.
- Ритов В.Б., Мельгунов В.М., Комаров П.Г. Интегральные белки мембран саркоплазматического ретикулума скелетных мышц кролика и карпа. Доклады АН СССР 1977;233(4):730–3.
- Татьяненко Л.В., Доброхотова О.В., Богданов Г.Н. и др. Действие амитриптилина, имипромина и хлорпромазина на активность фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата. Химико-фармацевтический журнал 2008;52(2):174–9.
- Выстороп И.В., Коновалова Н.П., Нелюбина Ю.В. и др. Циклические гидроксамовые кислоты на основе альфа-аминокислот. Сообщение 1. Региоселективный синтез, структура, NO-донорная и антиметастатическая активность спирибициклических гидроксамовых кислот на основе глицина и DL-аланина. Известия АН, серия химическая 2010;1:127–34.
- Выстороп И.В., Коновалова Н.П., Нелюбина Ю.В. и др. Циклические гидроксамовые кислоты на основе альфа-аминокислот. Сообщение 2. Региоселективный синтез, кристаллическая структура и противоопухолевая активность спирипиридин-имидазолидин-гидроксамовых кислот на основе глицина и DL-аланина. Известия АН, серия химическая 2013;5:1272–81.
- Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1973. С. 77–84.